

## 小腸平滑筋のリン脂質代謝に関する研究

ラット小腸平滑筋におけるリン脂質の *in vitro*  
での合成, 分解について

井 村 勝 之

札幌医科大学外科学第一講座 (主任 早坂教授)

札幌医科大学学生化学第二講座 (指導 坂上教授)

### Studies on Phospholipid Metabolism in the Small Intestinal Smooth Muscle

Biosynthesis and Degradation of Phospholipids in Rat  
Small Intestinal Smooth Muscle *in vitro*

Katuyuki IMURA

Department of Surgery (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief: Prof. H. Hayasaka)

Department of Biochemistry (Section 2), Sapporo Medical College

(Directed by Prof. T. Sakagami)

Phospholipid metabolism in the small intestinal smooth muscle was investigated *in vitro*.

The small intestines were incubated in a Krebs-Ringer bicarbonate solution (pH 7.4) at 37°C containing  $^{32}\text{P}$ i at various time intervals. The results clearly showed that the small intestinal smooth muscle synthesized phospholipids *in situ*, in spite of the fact that the degree of  $^{32}\text{P}$ i incorporation into the phospholipids was lower than that of the liver and small intestinal mucosa.

Among the phospholipids, specific radioactivity (SA) of phosphatidylinositol (PLI) separated from phosphatidylserine (PLS) was already higher than that of phosphatidic acid (PA) at 30 min incubation and also clearly higher than those of other phospholipids at 60 and 120 min. The same tendency was observed in the mucosa. SA of PLS was very low at each incubation time. SA of phosphatidylcholine (PLC) was already higher than that of phosphatidylethanolamine (PLE) at 30 min. The difference was more significant in incubation at a longer length of time. This is quite opposite to that observed in the liver, that is to say, under the same conditions SA of PLE was always higher than that of PLC in the latter.

In the incubation conditions used, degradation of the phospholipids was recognized in the smooth muscle as well as in the mucosa. The degree of the individual phospholipids was not always similar when the incubation time was short. In the percentage of decrease of the phospholipids it was found that the values were in the following order: PLI > PLE > PLC. However, the difference in degree of decrease among the individual phospholipids could not be observed in incubation at a longer length of time.

In PLE fraction, which consisted of three types, namely, diacyl, alkyl-acyl and alkenyl-acyl, hydrolysis of the diacyl fraction was more significant than those of the other two fractions.

### 緒 言

小腸の粘膜および小腸全体でのリン脂質代謝に関する研究はみられるが, 小腸平滑筋に関する研究は極めて少く 2~3 の報告<sup>1~3)</sup> をみるにすぎない. 著者は小腸平滑筋におけるリン脂質代謝の研究の一環として, Krebs-Ringer bicarbonate 液中でラット小腸切片と放射性無機リン酸 ( $^{32}\text{P}$ i) を 30 分, 60 分, 120 分, インキュベーションするこ

とにより小腸平滑筋においてもリン脂質の *de novo* 合成の存在をみた. 同時に小腸粘膜および肝における結果と比較検討した. この様に *in vitro* での小腸平滑筋, 粘膜における合成をみた報告はない.

著者は, さらに小腸平滑筋では今まで単離されていない phosphatidylinositol (PLI), phosphatidylserine (PLS), phosphatidic acid (PA), cardiolipin (Card), を再 thin-layer chromatography (TLC) により分離し, それぞれ

の組成を決定し、さらに合成および分解能を小腸粘膜および肝と比較検討した。

また、小腸両層をそれぞれインキュベーションした後 phosphatidylethanolamine (PLE) を穏和な酸およびアルカリで水解することにより、diacyl, alkenyl-acyl, alkyl-acyl 型の PLE の分解を比較検討した。

えられた実験結果から、小腸両層のリン脂質代謝について考察を行った。

## 実験方法

### 1. 材料

Wistar 系ラット (雌, 体重 170~230 g) を 18 時間絶食後、軽いエーテル麻酔下で開腹し、門脈を切断した後、心より氷冷の生理食塩水約 100 ml を注入し、肝および小腸を灌流後、肝および小腸を摘出した。

#### 1) 肝

肝は摘出後十分に濾紙で水分を除いた後、Stadie-Riggs tissue slicer を用いて厚さ 0.5 mm の肝切片として湿重量を測定し実験に用いた。

#### 2) 小腸

幽門輪直後より小腸末端までを可及的に腸間膜の附着しないように摘出した。摘出した小腸は、氷冷の生理食塩水にて内腔を洗浄し、濾紙にて水分を除き腸管を開き 2~3 cm の腸切片とし実験に用いた。なおインキュベーション (後述) に用いた腸片は、小腸の部位による差をなくするため上部、中部、下部腸管が平均して混じるようにし、小腸湿重量を測定した。

### 2. インキュベーション時の液の組成と条件

20 ml の Krebs-Ringer bicarbonate 液 (pH 7.4) に 3 g 前後の小腸片、或は肝切片を入れ、95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> の混合ガス気流中で 37°C, 5 分間プレインキュベーションした後、放射性無機リン酸 (<sup>32</sup>Pi) 2 mCi を加えて振盪しながら小腸は 30 分, 60 分, 120 分, 肝は 60 分, インキュベーションを行った。

### 3. ホモジネート調製

インキュベーション後、小腸は氷冷のガラス板上で片刃のカミソリの鈍な端にて粘膜と筋層に分離した。この方法では粘膜下層より漿膜に及ぶ層を筋層として用い、湿重量を測定した。粘膜層の湿重量は、小腸総湿重量と筋層湿重量の差で表わした。小腸粘膜層および肝は、4°C で Potter-Elvehjem ホモジナイザーを使用して 0.9% NaCl 溶液で 20% ホモジネートとした。小腸筋層は結合織を含むため片刃のカミソリで細断した後、乳鉢を用い粗のホモジネートを作製し、更に小腸粘膜層と同様にして 20% ホモジネートを調製した。

### 4. 脂質の抽出

脂質の抽出は 20 倍容量のクロロホルム:メタノール (2:1 v/v) を加えて一夜室温で放置し、抽出液は Folch 法<sup>4)</sup>により精製し、さらに窒素気流下で減圧乾固して残渣をクロロホルムにて一定容量とした。

### 5. 薄層クロマトグラフィー (TLC) による各リン脂質の分画

小腸筋層、粘膜層および肝のリン脂質の分画は、脂質抽出液の一部を 110°C, 2 時間活性化した 1 mM 炭酸ソーダ液で調製した厚さ 0.5 mm の Silica gel H (Merck) plate 上にスポットし、展開溶媒は lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PLE) の分離できる Skipski の変法であるクロロホルム:メタノール:酢酸:水 (100:60:14:4 by vol.<sup>3)</sup>) を用い、20°C で約 70 分間展開した (以後 Solvent system I と呼ぶ)。0.02% 2,7-ジクロロフルオレスセンのエタノール溶液を噴霧し、蛍光下で各リン脂質を識別した。各リン脂質はプレート上よりかき出した後、各 3 ml のクロロホルム:メタノール:酢酸:水 (50:39:1:10 by vol.) の混合溶液で室温にて 4 回抽出し、抽出液を 4 ml の 4 M アンモニア溶液で洗浄し、2,7-ジクロロフルオレスセンを除いた。さらに 4 ml の 50% メタノールを加えて洗浄した後、メタノールを加えて一定容量とした。

なお、この System I の展開溶媒では PLS と PLI および Card と PA がそれぞれ同一スポットとなるため、System I にて PLS+PLI 画分、Card+PA 画分をえ、それぞれ抽出したものを以下の方法で再 TLC を行った。

#### 1) Phosphatidylinositol と Phosphatidylserine の分離

System I の PLS+PLI 画分の抽出したものについて、前記と同様のプレートでクロロホルム:メタノール:7.5 M アンモニア (65:35:5 by vol.) で 70 分間展開した (Fig. 1)。

#### 2) Cardiolipin と Phosphatidic acid の分離

System I で分離した Card+PA 画分の抽出したものについて、厚さ 0.5 mm の塩を含まぬ Silica gel H プレート上にスポットし、アセトン:石油エーテル (1:3 v/v) で約 30 分間展開後、減圧下室温で 15 分間乾燥し、さらにクロロホルム:メタノール:酢酸:水 (80:13:8:0.3 by vol.) で約 40 分間展開した (Fig. 2)。

### 6. Phosphatidylethanolamine の mild acid hydrolysis および mild alkaline hydrolysis

System I で分離抽出した PLE をそれぞれ緩和な酸およびアルカリ水解した。すなわち mild acid hydrolysis は坂上と笠間の方法<sup>5)</sup>にもとずき、抽出液を減圧乾固の後、0.5 ml の 90% 酢酸を加え 55°C, 45 分間振盪しながら水解後、直ちに氷冷を行った。その後 N<sub>2</sub> 気流下で蒸発乾固し、

クロロホルム液として TLC に供し, acid stable (diacyl 型+alkyl-acyl 型) 画分と acid labile (alkenyl-acyl 型) 画分とに分離した. さらに acid stable 画分は, 抽出後 Dawson の方法<sup>6)</sup>にもとずき, mild alkaline hydrolysis を行ない, 水層 (diacyl 型) と有機溶媒層 (alkyl-acyl 型) に分離した.

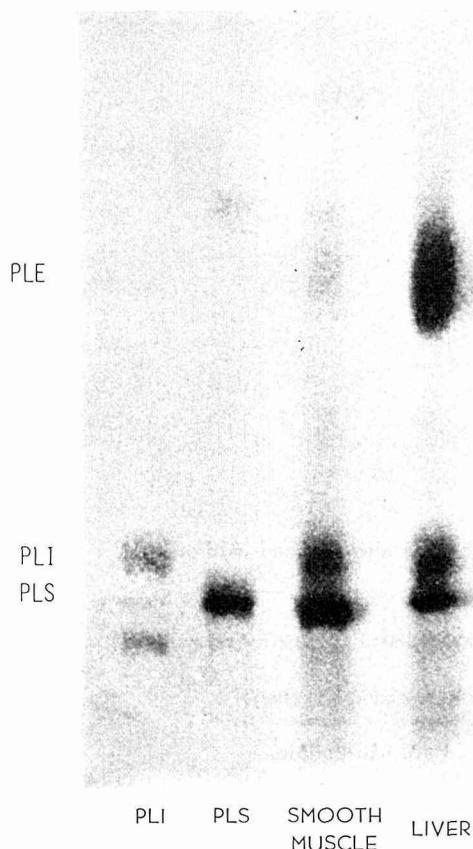


Fig. 1 Rechromatography of phosphatidylinositol +phosphatidylserine fraction

Developing solvent:

chloroform-methanol-7.5 M ammonia (65:35:5 by vol.)

Detection methods:

2% phosphomolybdic acid in ethanol and 0.25% ninhydrin in acetone, PLI and PLS are authentic samples.

(PLI+PLS) fraction was separated by TLC with chloroform-methanol-acetic acid-water (100:60:14:4 by vol.) as a mixed fraction.

Abbreviations:

PLI (phosphatidylinositol)

PLS (phosphatidylserine)

PLE (phosphatidylethanolamine)

## 7. タンパク質量, 脂質-リン量および放射能の測定

タンパク質の測定は Lowry らの方法<sup>7)</sup>, 脂質-リン量の定量は Bartlett の方法<sup>8)</sup>, 放射能は Geiger-Müller counter (Aloka TDC-I 型, 日本無線 Co.) でそれぞれ測定した.

## 実験成績

### 1. TLC による各リン脂質の分離

実験方法 5. の Solvent system I にて lysophosphatidylcholine (Lyso-PLC), sphingomyelin (Sph), phosphatidylcholine (PLC), Lyso-PLE, PLS+PLI, PLE, Card+PA の 7 つのリン脂質画分に分離できた. さらに PLS+PLI 画分, Card+PA 画分をそれぞれ再び TLC にて分離した.

#### 1) Phosphatidylserine と Phosphatidylinositol の分離

Fig. 1 は既知の PLI (Applied Science 製), PLS (Nakarai chemical 製) および筋層と肝の PLS+PLI 画分を展開したものである.

既知の PLI と PLS と筋層および肝の左側半分は 5% リンモリブデン酸で, また筋層と肝の右側半分は 0.25% ニンヒドリンで発色した. 既知のスポットと一致し, 両者は完全に分離できることを確めた.

#### 2) Cardiolipin と Phosphatidic acid の分離

Fig. 2 の左側 (I) は PLE, 既知の PA, Card (共に Sigma chemical 製) および筋層の Card+PA 画分を展開し, 5% リンモリブデン酸で発色したものである. PLE より上のスポットは 2 個で, それぞれ既知の PA と Card のスポットと一致した.

右側 (II) は小腸粘膜および肝の Card+PA 画分の Radioautogram で PLE より上に 2 つのスポットをみた. 以上のことから両者は完全に分離できることを確めた.

### 2. 小腸筋層, 粘膜層および肝のリン脂質量およびタンパク質量

小腸筋層, 粘膜層および肝の脂質-リン量, タンパク質量およびその比を Table 1 に示した. 組織重量当りの脂質-リン量, タンパク質量とも小腸筋層では粘膜よりやや少なかったが, その比は変わらず肝の約 1/2 であった.

### 3. 各組織のリン脂質組成

小腸両層および, 肝の各リン脂質組成を Table 2 に示した. 小腸両層で Lyso-PLC および Lyso-PLE の Lyso 体の割合が肝に比べて多かった. Sph は筋層で肝の 4 倍, 粘膜層で 2 倍の比率で存在することを認めた. PLI は肝で多く, 小腸両層では少なかった. 逆に PLS は小腸両層に多く, 肝では少なかった. PA の割合は, 筋層>粘膜>肝の

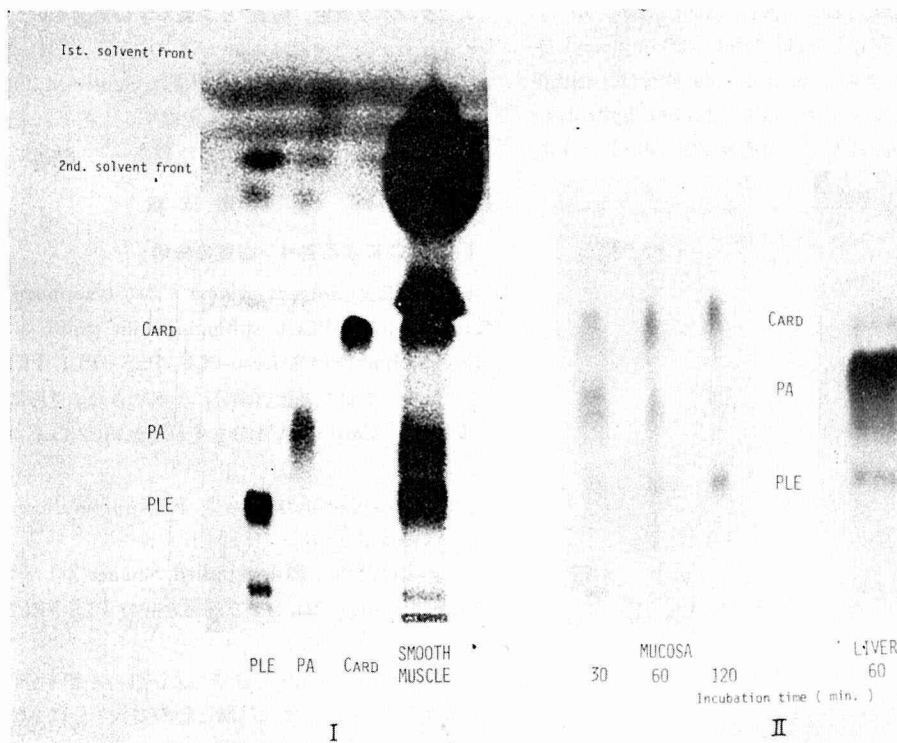


Fig. 2 Rechromatography of mixed fraction of phosphatidic acid and cardiolipin

Developing solvents:

1st. acetone-petroleum ether (1:3 v/v)

2nd. chloroform-methanol-acetic acid-water (80:13:8:0.3 by vol.)

PLE, PA and Card: authentic samples

I Detection method: 2% phosphomolybdic acid in ethanol

II Radioautograms of  $^{32}\text{P}$ -PA and  $^{32}\text{P}$ -Card

Abbreviations: PA (phosphatidic acid) Card (cardiolipin)

順であり、Card は肝で小腸両層より多かった。

#### 4. 小腸筋層、粘膜層および肝の総リン脂質への $^{32}\text{P}$ i のとり込み

小腸片および肝切片を  $^{32}\text{P}$ i とインキュベーションし、小

Table 1 Contents of phospholipid-phosphorus and protein in small intestinal smooth muscle, -mucosa and liver

Tissue	PL-P $\mu\text{g/g}$ tissue	Protein $\text{mg/g}$ tissue	PL-P/ Protein Ratio
Small intestinal smooth muscle	$297.1 \pm 43.9$	$140.6 \pm 13.4$	$2.11 \pm 0.26$
Small intestinal mucosa	$359.6 \pm 36.7$	$163.6 \pm 10.7$	$2.20 \pm 0.21$
Liver	$1165.7 \pm 93.1$	$264.4 \pm 11.3$	$4.41 \pm 0.30$

Values are the means  $\pm$  S.D. of 6 experiments.

PL-P: Phospholipid-Phosphorus

腸は 30 分、60 分、120 分後の、肝は 60 分後のリン脂質へのとり込みについて検討した。Fig. 3 は各組織におけるとり込みを specific radioactivity (SA) でグラフに示したものである。小腸両層では 120 分まではほぼ直線的に上昇する SA 値を示した。また各時間とも粘膜層の SA が筋層の約 2.5 倍の値を示した。60 分では筋層の SA 値は肝の約 1/7 であった。とり込みは、肝 > 粘膜 > 筋層の順であった。

#### 5. 各組織の各リン脂質への $^{32}\text{P}$ i のとり込み

Table 3 は小腸筋層および粘膜層、括弧内は肝におけるインキュベーション後の各リン脂質中にとり込まれた  $^{32}\text{P}$ i の割合を示したものである。60 分インキュベーション後の小腸両層および肝を比較すると、小腸両層では大きな違いはない。小腸両層を肝と比較すると PLE の割合は少く、PLI の占める割合が多いのが特徴的である。また Lyso-PLC, Lyso-PLE, Card, の占める割合がやや多い。

小腸両層の経時の変化では、筋層の PLE の割合は時間

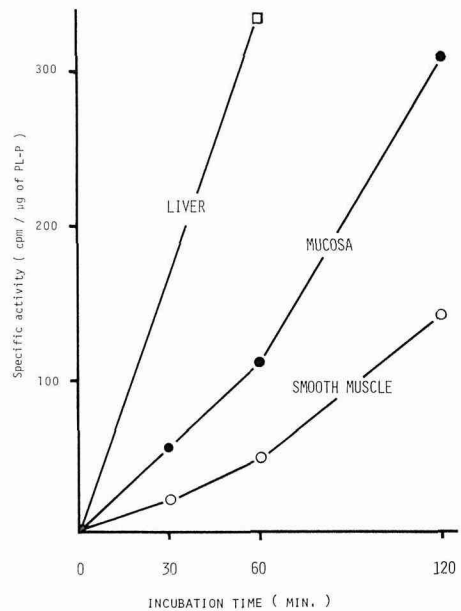
**Table 2** *Percent distribution of phospholipids in small intestinal smooth muscle, -mucosa and liver*

Tissue Phos- pholipids	Small intestine		Liver
	Smooth muscle	Mucosa	
Lyso-PLC	3.3±0.3	2.9±0.5	1.1±0.2
Sph	17.5±0.6	8.8±0.7	4.8±0.3
PLC	35.0±0.8	42.9±2.1	48.4±1.2
Lyso-PLE	5.6±0.4	6.6±0.6	0.7±0.3
PLI	3.6±0.3	3.8±0.6	6.6±0.5
PLS	6.3±0.4	5.3±1.0	3.4±0.4
PLE	20.4±0.9	21.9±0.9	25.3±0.8
PA	3.3±0.2	2.8±0.2	1.6±0.4
Card	5.0±0.3	5.0±0.6	8.1±0.5

Values are the means±S.D. of 5 experiments.

Abbreviations:

- Lyso-PLC: lysophosphatidylcholine
- Sph: sphingomyelin
- PLC: phosphatidylcholine
- Lyso-PLE: lysophosphatidylethanolamine
- PLI: phosphatidylinositol
- PLS: phosphatidylserine
- PLE: phosphatidylethanolamine
- PA: phosphatidic acid
- Card: cardiolipin

**Fig. 3** *Changes of specific activities of total phospholipids in small intestinal smooth muscle, -mucosa and liver at various incubation times*

Incubation condition:

- Tissue: small intestine (3-4 g) liver (about 3 g)
- Volume: 20ml Krebs-Ringer bicarbonate solution
- Isotope: 2 mCi of  $^{32}\text{P}$ i
- Temperature: 37°C

**Table 3** *Percent distribution of radioactivity of individual phospholipids in small intestinal smooth muscle, -mucosa and liver at each incubation time*

Incubation time (min.)	Smooth muscle			Mucosa		
	30	60	120	30	60	120
Phospholipids						
Lyso-PLC	2.7±0.8	2.3±0.6 (0.5)	2.6±0.4	1.3±0.3	1.2±0.3	2.9±0.3
Sph	2.7±1.1	3.8±1.9 (1.9)	3.2±0.2	3.5±0.5	2.1±0.3	2.6±0.6
PLC	30.3±5.0	43.1±4.1 (38.5)	53.6±3.2	29.5±2.4	40.5±3.2	44.2±2.0
Lyso-PLE	5.8±1.4	3.5±0.9 (1.7)	5.0±1.8	5.9±1.4	3.8±0.9	5.3±0.6
PLI	16.3±2.4	19.0±1.5 (8.5)	18.4±1.5	16.8±1.7	20.0±1.6	17.8±2.1
PLS	4.1±0.8	2.7±0.4 (3.5)	1.6±0.6	4.7±1.9	3.5±0.2	2.5±0.6
PLE	14.8±2.5	11.4±1.4 (31.1)	7.7±0.6	19.3±2.5	15.1±2.9	16.5±0.9
PA	16.5±3.5	9.0±0.4 (12.9)	4.6±0.9	11.6±2.7	7.4±1.7	4.0±1.2
Card	6.8±1.7	5.2±0.6 (1.4)	3.3±0.3	7.4±1.3	6.4±1.6	4.2±1.1

Values are the means±S.D. of 5 experiments.

Values in parentheses show radioactivity distribution in liver.

Incubation conditions are the same as shown in Fig. 3.

Abbreviations are the same as shown in Table 2.

**Table 4** *Changes of specific activities of individual phospholipids in small intestinal smooth muscle, -mucosa and liver at each incubation time*

Phospholipids	Incubation time (min.)	Smooth muscle			Mucosa			Liver
		30	60	120	30	60	120	
Total		22	49	143	56	112	312	336
Lyso-PLC		10	37	78	14	18	162	119
Sph		4	12	24	14	16	47	116
PLC		17	73	261	39	106	410	278
Lyso-PLE		16	25	120	38	39	144	245
PLI		104	391	710	225	509	1060	400
PLS		11	17	37	27	59	84	244
PLE		16	33	76	54	78	232	396
PA		88	122	197	248	263	378	1545
Card		28	61	135	74	106	172	131

Values are the means of 5 experiments.

Incubation conditions are the same as shown in Fig. 3.

Abbreviations are the same as shown in Table 2.

Specific activity: cpm/ $\mu$ g of lipid-P

とともに減少し、粘膜では大きな減少がみられない点を除くと非常に似たパターンを示した。すなわち PLC が時間と共に著明に増加し、PA は逆に著明に減少した。PLI はほとんど変化なく PLS, Card はやや減少した。

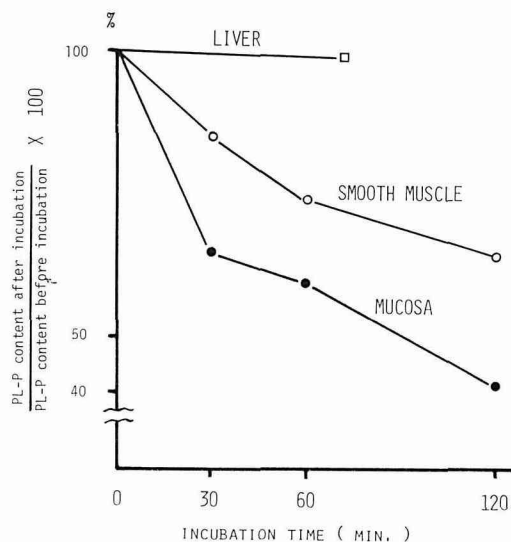
Fig. 2 の右側 (II) は小腸粘膜層と肝における Card+PA 画分の再 TLC の Radioautogram である。これから Table 3 の粘膜における PA と Card の関係、すなわちインキュベーション後 30 分で PA>Card, 60 分で PA $\approx$ Card, 120 分で PA<Card の関係が明らかである。一方肝の 60 分インキュベーションでは PA $\gg$ Card の関係にあり、PA と Card のとり込みパターンが小腸粘膜および筋層と肝では著しく異なることが明らかとなった。

Table 4 は小腸筋層、粘膜および肝の総リン脂質および各リン脂質へのとり込みを SA で表わしたものである。小腸筋層を粘膜と比べると、筋層では 30 分インキュベーションですでに PLI の SA が PA より高いこと、PLE の SA の上昇がかなり急であること、120 分インキュベーションで Lyso-PLE の SA が PLE より高いこと、PLI の SA の上昇カーブが急であるなど、やや異なる点はあるが、全般的には近似したパターンを示した。すなわち小腸両層では PLC と PLI の SA 値が時間とともに急激に上昇すること、PLC の SA 値は常に PLE より高いこと、PA の SA 値の経時的上昇はかなり急であること、Sph, PLS は常に低い SA 値を示すことなどが観察された。一方、60 分インキュベーション後の肝では、PA $\gg$ PLI, PLE>PLC, Lyso-PLE, PLS>Card, Lyso-PLC, Sph の順であった。この

様に小腸両層と肝では明瞭に異なるパターンを示した。

#### 6. 小腸筋層、粘膜層および肝のインキュベーションによる総リン脂質およびタンパク質量の変化

Fig. 4 は各組織のインキュベーション後の脂質-リン量の変化を、インキュベーション前の値を 100 とした時の各時間の値をグラフで示したものであり、Fig. 5 は同様にタ



**Fig. 4** Changes of phospholipid content in small intestinal smooth muscle, -mucosa and liver at various incubation times

Incubation conditions are the same as shown in Fig. 3.

ンパク質量のインキュベーションによる変化をグラフに示したものである。

脂質-リン量 (Fig. 4) は肝ではインキュベーション前後

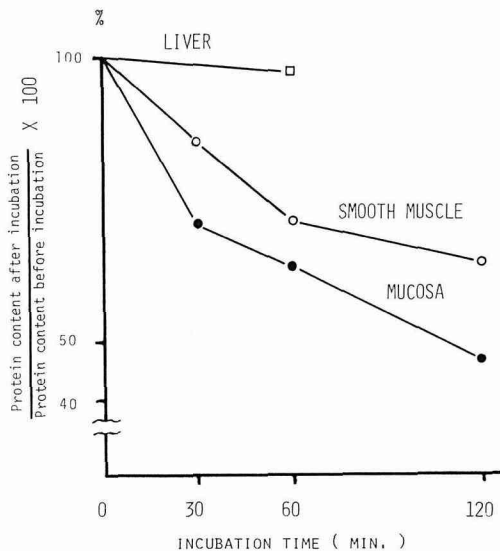


Fig. 5 Changes of protein content in small intestinal smooth muscle, -mucosa and liver at various incubation times

Incubation conditions are the same as shown in Fig. 3.

で変化はみられないが、小腸両層では時間とともに減少した。小腸筋層では60分まで直線的に減少し、その後の減少はゆるやかとなった。一方粘膜層では30分まで急激に減少がみられた。120分インキュベーションで筋層では36% 粘膜では58%の減少を示した。

一方、タンパク質量の変化 (Fig. 5) もリン脂質量の変化とよく似たパターンを示し、タンパク質量とリン脂質量は平衡して減少することを認めた。

#### 7. 小腸筋層、粘膜層の各リン脂質量の変化

Fig. 6 は小腸筋層と粘膜の組織 1g 当りのインキュベーションによる各リン脂質量の変化を棒グラフで示したものである。

肝ではインキュベーション前後の各リン脂質量に変化は認めず、データは省略した。

小腸筋層では Lpso-PLC, Lyso-PLE を除いたすべてのリン脂質でインキュベーション時間と共に減少を認めたが、量的には PLC, PLE が最も多く減少した。減少率でみると30分インキュベーション後で、PLI が26%と一番多く、次いで PLE, PLC の順であった。120分インキュベーションでは PLE, PLI, PLC, Card, PLS などが40%以上の減少を示した。

一方、粘膜でも各リン脂質で筋層と同様の傾向を示したが、筋層に比べ各リン脂質ともより大きく減少した。30分インキュベーション後で、PLC, PLI, PLE が約40%の

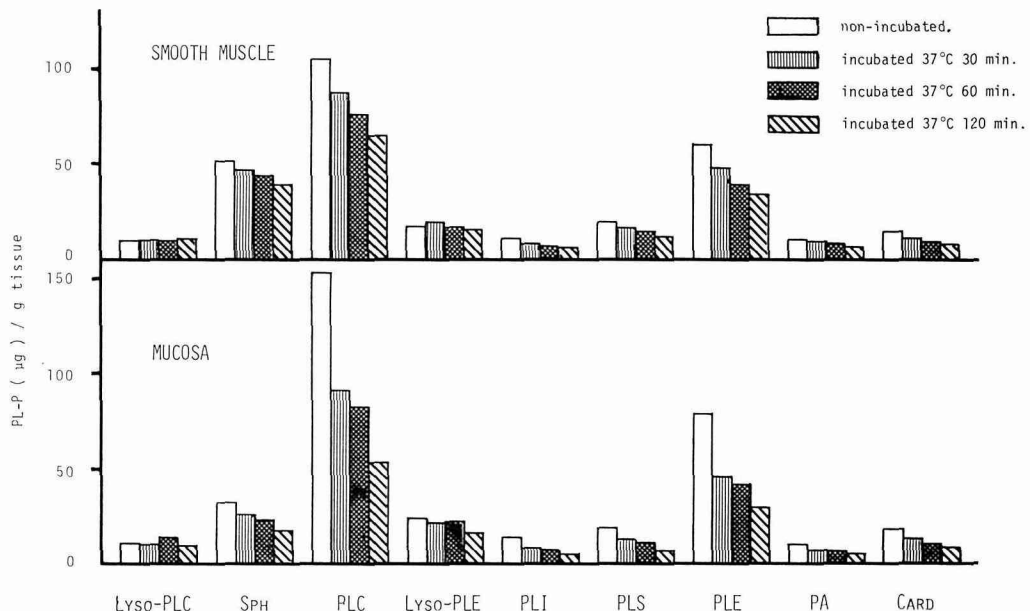


Fig. 6 Changes of amounts of individual phospholipids in small intestinal smooth muscle and -mucosa after incubation

Incubation conditions are the same as shown in Fig. 3.



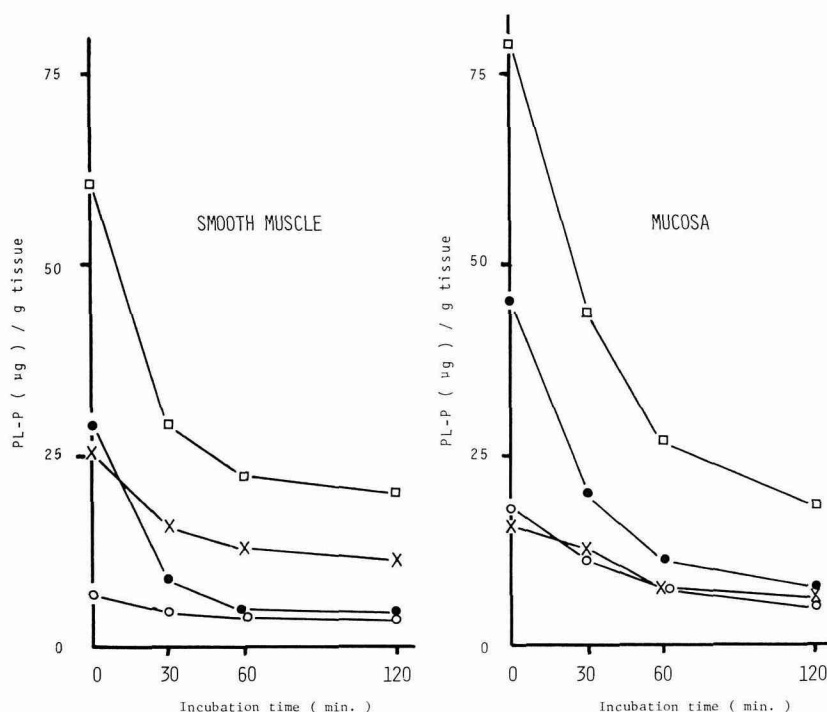


Fig. 7 Changes of amounts of phosphatidylethanolamine fraction and diacyl, alkyl-acyl, alkenyl-acyl-glycerolphosphorylethanolamine in small intestinal smooth muscle, -mucosa after incubation

□—□ PLE: (diacyl+alkyl-acyl+alkenyl-acyl)-GPE  
●—● diacyl-GPE ○—○ alkyl-acyl-GPE ×—× alkenyl-acyl-GPE

Values are the means of 3 experiments.

The intestinal smooth muscle and mucosa separated, were homogenated respectively. About 1g of each tissue were incubated in 10 ml of Krebs-Ringer bicarbonate solution at 37°C. PLE fraction was separated by TLC with chloroform-methanol-acetic acid-water (100:60:14:4 by vol.) as developing solvent. See text on analysis of three types of PLE. Abbreviation: GPE (glycerylphosphorylethanolamine)

減少率を示した。120分インキュベーション後では、PLC, PLI, PLS, PLEが60%以上の減少を示した。

#### 8. 小腸筋層、粘膜層のインキュベーションによる Phosphatidylethanolamine の diacyl 型, alkyl-acyl 型および alkenyl-acyl 型の変化

Fig. 7は小腸筋層、粘膜組織、それぞれ約1gを30分、60分、120分インキュベーションした後のPLEを穏和な酸、アルカリ分解をすることによりdiacyl型、alkyl-acyl型、alkenyl-acyl型PLE量の変化を組織1gあたりで示した。

インキュベーション前の割合は、小腸筋層でdiacyl型48%, alkyl-acyl型12%, alkenyl-acyl型40%, 一方粘膜ではそれぞれ57%, 24%, 19%であった。小腸筋層ではインキュベーション後、PLE全体では30分までは急激に減少し、それ以後の減少は僅かであり、その減少カーブは

diacyl型のカーブと平行している。

alkyl-acyl型、alkenyl-acyl型PLEの分解は少なかった。30分インキュベーション後の分解の割合をインキュベーション前と比べると総PLEで52%, diacyl型で70%, alkyl-acyl型で34%, alkenyl-acyl型で39%の減少を認めた。

粘膜でも同様の傾向を認めるが、総PLE, diacyl型PLEの急激な減少は60分インキュベーションまで続いた。alkyl-acyl型、alkenyl-acyl型PLEの減少は筋層同様僅かであった。30分インキュベーション時の減少率は、総PLEで45%, diacyl型56%, alkyl-acyl型38%, alkenyl-acyl型22%であった。以上の様に小腸両層の総PLEのインキュベーションによる水解の主体はdiacyl型PLEであった。



## 考 察

ラット小腸におけるリン脂質代謝に関する研究として、小腸粘膜および小腸全体のものは多数みられるが、小腸筋層に関する研究は、*in vivo* での小数の報告<sup>1~3,12)</sup> しかない。

著者は腸切片と  $^{32}\text{P}$ i を Krebs-Ringer bicarbonate 液中でインキュベーションすることにより、小腸平滑筋における各リン脂質の *in vitro* での合成および分解について検討した。同時に小腸粘膜および肝と比較検討した。

小腸平滑筋におけるリン脂質合成を  $^{32}\text{P}$ i を使って *in vivo* で観察した実験として Noma<sup>12)</sup>、斎藤<sup>1)</sup>、皆川<sup>2)</sup> の報告があるが、*in vitro* における小腸筋層のリン脂質の合成を検討した研究は、著者の調べた限り本実験が始めてである。

さらに小腸平滑筋においては、今まで単離されていない PLI, PLS, PA, Card を分離し、その他のリン脂質を含めて、その組成、合成能、分解能を調べ小腸粘膜および肝と対比して実験を行った。

小腸を平滑筋と粘膜に分離する方法は、堀内<sup>9)</sup>、皆川<sup>2)</sup> により証明された組織学的にも両層の混入のない方法でおこなった。

Nielsson ら<sup>10)</sup> により Lyso-PLC の吸収および代謝は、小腸部位による差はないという報告もあるが、他方 Mansbach<sup>11)</sup> は lysolecithin acyltransferase, diglyceride acyltransferase 活性は、上部小腸で強い活性を示すと報告しているので、各インキュベーションに用いた腸管は、上部、中部、下部が各インキュベーション液中に均等に混じるように配慮した。さらに小腸両層では phospholipase 活性が非常に強いので、分離の一連の操作を 4°C で施行した。

小腸筋層のリン脂質画分への  $^{32}\text{P}$ i のとり込みの研究で、Noma<sup>12)</sup> は小腸内腔に直接  $^{32}\text{P}$ i を注入後摘出した小腸筋層で粘膜層と同様の  $^{32}\text{P}$ i のとり込みを報告している。他方、斎藤<sup>1)</sup> は頸静脈より  $^{32}\text{P}$ i を注入後、筋層のリン脂質合成能を SA で粘膜と比較した。筋層では1時間後で粘膜の約 1/2、3時間後で約 1/4 の SA であることを見出し、小腸筋層でのリン脂質の合成能は粘膜層に比べて低いことを報告している。

著者は *in vitro* で Fig. 3 に示す如き結果をえ、30分から120分インキュベーションでは小腸筋層で粘膜の 1/2-2.5 の、60分で肝の約 1/7 の SA 値をみた。この様に小腸筋層でのリン脂質代謝活性は、肝、粘膜に比較して低いことを認めた。小腸切片で行ったと同様に小腸筋層と粘膜層を分離後、各々インキュベーションした実験でも、小腸筋層に

$^{32}\text{P}$ i のとり込みをみた。このことから他臓器、血液、小腸粘膜の影響のない状態、すなわち小腸平滑筋自体でも  $^{32}\text{P}$ i のとり込みがおこり、小腸平滑筋でのリン脂質の *de novo* 合成機能の存在が明らかとされた。

小腸平滑筋における PLI, PLS, Card, PA の組成についての報告はない。また、小腸粘膜でのこれらのリン脂質についても Gurr<sup>13)</sup>、Noma<sup>14)</sup>、Collins<sup>15)</sup> の報告しかみられない。

PLI と PLS を TLC により分離する方法として Skipski<sup>16)</sup> の一次元による方法もあるが、臓器の違いによる各リン脂質組成が異なるためか、小腸両層では十分に分離することは難しかった。著者は、両リン脂質の Rf 値の差の比較的大きい Skidmore<sup>17)</sup> の二次元による分離方法の第一次展開溶媒を使い、展開時間を長くすることを試み分離が可能となった。その結果、小腸平滑筋層における PLI は全リン脂質の 3.6%、PLS は 6.3% であった。一方同時に検討した粘膜では、3.8%、5.3%、肝では 6.6%、3.4% の割合を示した (Table 2)。Gurr<sup>13)</sup> は粘膜で 4.1%、5.2%、肝で 6.9%、4.1% と報告しており、粘膜、肝ともに本実験結果と似た割合を示している。また Skipski<sup>18)</sup> は、肝で PLI 8.8%、PLS 3.0% と報告している。いずれにしても小腸平滑筋では PLS が多く、PLI が少ない。この傾向は粘膜でも認められ、肝とは逆の関係にあり、この組成の違いが機能の発現にどのような影響をもつかは、さらに検討が必要とされる。

PA と Card の分離は Skipski ら<sup>19)</sup> の酸性リン脂質を分離する方法に従って分離した。小腸平滑筋層で、PA が 3.3%、Card が 5.0% であり、粘膜層で 2.8%、5.0%、肝では 1.6%、8.1% であった (Table 2)。粘膜における割合としては Gurr<sup>13)</sup> が 3.2%、2.8%、Noma<sup>14)</sup> が 1.8%、4.6%、肝における割合では、PA に関してはほとんどの報告で極めて少いとしているが、Wuthier<sup>20)</sup> は 0.8%、Collins<sup>15)</sup> は 2.0% の値を報告している。小腸粘膜と肝を同時に観察している Gurr<sup>13)</sup>、Collins<sup>15)</sup> はいずれも PA の割合が小腸粘膜では肝の場合より多いことを観察しており、著者の成績と一致した。しかしながら著者は phosphatidylglycerol (PLG) を単離できず、その割合が PA に加わり、割合が多少多くなっていることも考えられるので、さらに実験を重ねて解明の必要がある。

肝における PLE の代謝が活発であるという多数の報告<sup>1,12,21~23)</sup> があり、*in vivo*、*in vitro* 両方で認められている。本実験でも肝スライスの 60 分インキュベーション後の各リン脂質で PLE の比活性が PLC より高いことが明らかにされた (Table 4)。他方、小腸両層では斎藤<sup>1)</sup>、皆川<sup>2)</sup>、堀内<sup>9)</sup> の頸静脈より  $^{32}\text{P}$ i を投与後の *in vivo* の実験

では、1時間以後の小腸両層で PLC の SA が PLE のそれより常に高いことが見いだされた。in vitro での本実験でも  $^{32}\text{P}$ i と共にインキュベーションした小腸両層で短時間から PLC の比活性が PLE のそれより高いことが明らかにされた (Table 4)。これらの事実は小腸両層の PLC と PLE の代謝活性が肝とは異なることを示し、それぞれの組織の機能との関連において興味ある知見である。

肝における PLC 合成経路としては Kennedy 経路による以外に PLE のメチル化による合成経路<sup>24,25)</sup>がかなりの比重を占めているとみなされている。しかし小腸粘膜では PLE のメチル化による合成経路は否定的であり<sup>24,26)</sup>、この点がある程度合成パターンの違いに関与しているかも知れない。

Paltauf<sup>27~29)</sup> は小腸粘膜に alkenyl-acyl, alkyl-acyl 型の PLE および PLC の存在を、斎藤<sup>30)</sup> は小腸平滑筋層に alkenyl-acyl 型の PLE および PLC の存在を報告している。山田<sup>31)</sup> は両層における PLE および PLC の diacyl, alkyl-acyl, alkenyl-acyl 型の割合および脂肪酸組成について詳細な報告をしている。著者も PLE を mild acid hydrolysis および mild alkaline hydrolysis することにより、筋層で diacyl 型 48%, alkyl-acyl 型 12%, alkenyl-acyl 型 40%, 粘膜では diacyl 型 57%, alkyl-acyl 型 24%, alkenyl-acyl 型 19% という結果をえた (Fig. 7)。これらの値は Paltauf<sup>29)</sup>、斎藤<sup>30)</sup>、山田<sup>31)</sup> らの成績に一致した。肝では PLC, PLE とともに diacyl 型が 90% 以上を占める。小腸両層でも PLC では diacyl 型が両層とも約 85~90% を占めている。しかし PLE では代謝回転が遅い<sup>30)</sup>とみなされている alkenyl-acyl 型が筋層で 40%, 粘膜で 19% も含まれている。斎藤<sup>30)</sup> はこれらの影響をみるため acid stable PLE (diacyl+alkyl-acyl 型の PLE) と PLC を比活性で比較し、なお PLC の SA が高かったと報告している。小腸では diacyl 型の PLC および PLE が共に Kennedy 経路により生成されると考えられることから、両リン脂質の臓器による合成能そのものに差があることも考えられる。例えば小腸粘膜における PLC の代謝が活発であるという多数の報告<sup>10~12,32~34)</sup>があり、食飼性の PLC は Lyso-PLC として小腸粘膜より吸収され、再アシル化され、これが共存する脂肪の移動形であるキロミクロンの形成に関与し、リンパ液中の PLC へと活発に移行<sup>10,32,33)</sup>する。また脂肪吸収時には、リン脂質のうち小腸粘膜では PLC の合成がとくに著しく促進するという報告<sup>12,24)</sup>がある。著者もオリブ油を与えた2時間後の小腸切片を使った in vitro の実験で、小腸粘膜の PLC のみの合成の促進をみた。この傾向は筋層では認められなかった。脂肪吸収時に PLC の合成が促進するのは、キロミクロンの形成に

関与するためと考えられ、小腸粘膜に特有な機能とリン脂質代謝の関連性が強く想定される。しかし吸収という機能をもたぬ小腸筋層でも、PLC の比活性が PLE よりも高く、さらに研究をして解明しなければならない点であろう。

イノシトールリン脂質の研究は、脳、神経などで多数の研究<sup>35,36)</sup>があり、 $^{32}\text{P}$ i が速かにとりこまれ、代謝回転も速かであること、diphosphoinositide (DPI), triphosphoinositide (TPI) の存在も知られている。小腸粘膜でも in vivo の実験で Gurr<sup>13)</sup>、Noma<sup>12)</sup> は PLI の比活性の高いことを報告している。また小腸筋層では斎藤<sup>1)</sup> が whole homogenate、皆川<sup>2)</sup> は細胞分画したすべての画分で (PLI+PLS) 画分の比活性が高いことから PLI の比活性が非常に高いことを示唆している。本実験では、インキュベーション後両リン脂質を分離して、両層の PLI が圧倒的に高い SA を示した (Table 4)。すなわち筋層では各時間で総リン脂質の 5~7 倍の SA 値を見出した。Gurr<sup>13)</sup> は粘膜で  $^{32}\text{P}$ i 注入後 30 分で PLI の SA 値が総リン脂質 SA の約 4 倍であったと報じている。著者の in vitro で 30 分、60 分、120 分インキュベーション後で約 4 倍の SA 値を粘膜でみた。この様に総リン脂質に対する PLI の相対的活性の高さは、小腸筋層において粘膜より強く認めた (Table 4)。この様な傾向、さらにリン脂質組成で Sph, PLS などが多く、小腸筋層でより神経組織に似た組成を示すこと、また小腸両層にはマイスネル、アウエルバッハ両神経叢が含まれていること、本実験では神経叢が多く存在する粘膜筋板まで筋層に含めていることを考え合わせると、これら神経叢の影響をうけていることも考えられる。末梢神経にも DPI, TPI の存在が示されているが、小腸ではこれらのリン脂質の存在は明らかでない。従ってこの様に高い PLI の比活性が、小腸平滑筋の monophosphoinositide のみのものなのか、或は DPI, TPI の影響によるかは明らかでない。今後の検討が必要な点である。

リン脂質合成経路の重要な中間体である PA の比活性が高いことはすべての組織で報告されている。本実験でも肝では 60 分インキュベーション後の SA 値は、総リン脂質の 4.6 倍と圧倒的に高い SA 値を示した。しかし小腸両層の 30 分、60 分、120 分インキュベーション後の筋層では総リン脂質の SA 値のそれぞれ 5 倍、2.5 倍、1.5 倍、粘膜層で 4 倍、2.5 倍、1.2 倍という結果であった (Table 4)。この様に小腸両層の PA の SA 値はインキュベーション後 30 分では高い値を示したが、それ以後の SA 値の上昇はかんまんであった。なお PA には PLG の混在の可能性があり、これが PA 画分の比活性に関係することが一応考えられる。しかし同一条件での肝と比べて小腸両層の PA の比活性が低いことは、CMP. PA+Inositol→PLI+CMP の

経路でできる PLI の比活性が圧倒的に高いことと合わせて、さらに検索の必要がある。

小腸両層をそれぞれホモジネートしてインキュベーションすることにより総リン脂質量が減少することは、0.9% NaCl 液を使っての工藤<sup>3)</sup>の報告がある。本実験でも同様の傾向を認めた。すなわち 30 分インキュベーション後に小腸筋層で約 15%、粘膜で約 35% の総リン脂質量の減少を認めた (Fig. 4)。しかし両層とも工藤<sup>3)</sup>の報告に比べ約半分の水解にとどまった。本実験ではインキュベーションを腸片で行ったこと、また O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> 混合ガス気流中でインキュベーションした点が異なる。生体内ではこの様に著しい水解による総リン脂質量の減少は考えられず、より生体に近い系での本実験では、水解が抑制されたものと考えられる。

小腸粘膜における phospholipase の存在については多くの報告がある。Gallai-Hatchard<sup>37)</sup>, Epstein<sup>38,39)</sup> と Robertson<sup>40)</sup> は PLC が小腸粘膜で水解されることを報告している。しかし分解産物がすべて lyso-PLC としては回収されず、水溶性の GPC まで水解されることから lyso-lecithinase の活性は lecithinase の 10 倍以上であると報告している。しかも lyso-PLC の蓄積は deoxycholate の存在下でのみ認めている<sup>37,41)</sup>。また Gallai-Hachard<sup>37)</sup> は deoxycholate の存在のもとでも臓器による差があり、小腸粘膜では PLC の減少のうち lyso-PLC として回収される最大量は 79% であったと報告している。一方 phospholipase B 活性<sup>40),42~45)</sup> を示唆した報告もみられる。この様に lysophospholipase, phospholipase B の強い活性の存在は、PLC, lyso-PLC が水溶性の GPC まで水解されることを示しており、本実験の結果もそれを支持している。

PLE の水解については Ottolengi<sup>45)</sup> が小腸粘膜を使って、Schmidt<sup>46)</sup> らは小腸粘膜のミトコンドリアを使って PLC と同様の水解をみている。すなわち phospholipase は PLE に対しても PLC と同様の機構により活性を示すことを示唆している。

小腸筋層における各リン脂質の水解を調べた工藤<sup>3)</sup>の報告があり、筋層にも phospholipase 活性が存在すること、各リン脂質に対する phospholipase 活性は粘膜より弱いこと、PLI+PLS 画分の減少率が最も多く認められ、PA+Card 画分の減少率は少なかったと報告している。

本実験では 30 分、60 分、120 分インキュベーション後の各リン脂質について水解の程度を調べた (Fig. 6)。量的には PLC, PLE の水解が最も著しいが、lyso-PLC, lyso-PLE の lyso 体としての蓄積は明らかに認められず、従来の報告と一致した。小腸筋層では 60 分インキュベーションまでは、減少率でみると PLI, PLE, PLC, Card の順

で水解の程度が強く、120 分インキュベーション後では、各リン脂質とも同程度の水解を認めた。粘膜層でも同様の傾向を認め、短時間のインキュベーションでは、減少率でみると両層とも PLI の phospholipase 活性を最も強く認めた。Artherton と Hawthorne<sup>47)</sup> が小腸粘膜の PLI で phospholipase C 様活性の存在を報告しており、この影響で PLI に強い活性を認めたのかも知れないが、この点についてはさらに検討の必要がある。

本実験では PLS, Card などでもかなり強い活性を認めたが、組織中に少ないリン脂質については、単離した後それぞれの水解を調べることでより明らかにされるであろう。

いずれにしても小腸筋層にも粘膜同様、phospholipase A, lysophospholipase (phospholipase B) 活性が認められ、同じ条件下での肝スライスでは著明な分解は認められず、興味のある問題であり、さらに追求の必要がある。

小腸両層における PLE の  $\alpha$  位が alkyl 型, alkenyl 型のものが多いことは前述したが、この両型と  $\alpha$  位が acyl 型の場合で phospholipase の作用の仕方が異なることも考えられる。工藤<sup>3)</sup> は acid stable PLE (diacyl+alkyl-acyl 型) と acid labile PLE (alkenyl-acyl 型) で phospholipase 活性を比較し、両者に著しい差のないことを報告している。本実験では diacyl-, alkyl-acyl-, alkenyl-acyl-PLE の水解の程度を調べた。その結果小腸筋層で diacyl 型の PLE が最も水解され、30 分インキュベーションで約 70% が水解された。一方, alkyl-acyl, alkenyl-acyl 型は 30 分インキュベーションで 34%, 39% の水解にとどまった。粘膜でも diacyl 型 PLE の水解が極めて強く、30 分インキュベーションで約 60% の水解を示した。alkyl-acyl 型, alkenyl-acyl 型は 38%, 22% の水解にとどまった (Fig. 7)。

Waku<sup>48)</sup> らは、卵黄や牛の心臓の PLC から合成した 1-acyl-, 1-alkyl-, 1-alkenyl-2-linoleoyl-GPC に対して、種々の phospholipase を作用させて、水解の程度が異なることを報じている。しかし、本実験の様に臓器における phospholipase 活性が三つの型で異なるという報告はなく、非常に興味のある問題である。この差が  $\alpha$  位の違いによる phospholipase A<sub>2</sub> の相異によるものか、ビニルエーテルあるいはエーテル結合を切断する酵素系とエステル結合を切断する酵素の活性の相異によるかは、今後の研究をまたねばならない。

小腸筋層のリン脂質代謝について、いくつかの新しい知見をえたが、なおその機能との関連で今後さらに研究が必要であろう。

## 要 約

ラット小腸片を Krebs-Ringer bicarbonate 液中で <sup>32</sup>Pi

とともに 37°C でインキュベーションを行い、ラット小腸平滑筋のリン脂質代謝を *in vitro* で研究した。

1) 小腸平滑筋における  $^{32}\text{P}$  のとり込みは、肝や小腸粘膜に比べて低いが、明らかにリン脂質中に見い出され、平滑筋自体でもリン脂質を *de novo* 合成することを確認した。

2) 小腸平滑筋における単離した phosphatidylinositol (PLI) の specific activity (SA) は 30 分インキュベーション後で、すでに phosphatidic acid (PA) の SA より高く、60 分、120 分後では他のリン脂質に比べ圧倒的に高い SA 値を示した。一方 phosphatidylserine (PLS) の SA は各時間とも低かった。粘膜でも同様の傾向を示した。

3) Phosphatidylcholine (PLC) の SA は 30 分インキュベーション後ですでに phosphatidylethanolamine (PLE) の SA より高く、60 分、120 分では、より差が著明であった。この関係は、肝における比活性が  $\text{PLE} > \text{PLC}$  であるのと逆の結果であった。

4) インキュベーション後、小腸平滑筋で粘膜と同様リン脂質の分解が認められ、30 分インキュベーション後で各リン脂質の水解率を比べると  $\text{PLI} > \text{PLE} > \text{PLC}$  の順であった。120 分インキュベーション後では、各リン脂質の水解率に大きな違いは認められなかった。

5) PLE 画分の水解の程度を diacyl-, alkyl-acyl, alkenyl-acyl, PLE の三者で比較したところ、diacyl 型 PLE の水解の程度が他の二者より極めて強いことが認められた。粘膜層でも同様の傾向にあった。

稿を終るにあたり、終始有益な助言をいただいた本学学生化学第二講座谷口正子講師に深く感謝致します。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費により行った。

(昭和 50. 6. 12 受理)

## References

- 1) 斎藤 徹：小腸平滑筋のリン脂質代謝に関する研究。  
1. ラット小腸平滑筋のリン脂質組成、phosphatidylcholine および phosphatidylethanolamine の分子種ならびにリン脂質代謝について。札幌医誌 42(1), 72-82 (1973)。
- 2) 皆川和広：小腸平滑筋のリン脂質代謝に関する研究。  
1. ラット小腸平滑筋の細胞分画後の各画分のリン脂質組成ならびに代謝について。札幌医誌 43(2), 87-97 (1974)。
- 3) 工藤信夫：ラット小腸平滑筋のリン脂質の分解に関する研究。札幌医誌 43(2), 1-13 (1974)。
- 4) Folch, J., Lee, M. and Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509 (1957)。
- 5) 坂上利夫, 笠間将榮: Plasmalogen (acetal phospholipid) の微量定量法。生化学 28, 712-713 (1957)。
- 6) Dawson, R. M. C.: A hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipids in biological samples. Biochem. J. 75, 45-53 (1960)。
- 7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1956)。
- 8) Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234, 466-468 (1959)。
- 9) 堀内 勇：小腸粘膜のリン脂質に関する研究。1. ラット小腸粘膜の細胞分画後の各画分のリン脂質組成ならびに代謝について。札幌医誌 42(6), 447-456 (1973)。
- 10) Nilsson, A. and Borgström, B.: Absorption and metabolism of lecithin and lysolecithin by intestinal slices. Biochim. Biophys. Acta 137, 240-254 (1967)。
- 11) Mansbach, C. M., II.: Complex lipid synthesis in hamster intestine. Biochim. Biophys. Acta 296, 386-400 (1973)。
- 12) Noma, A.: Studies on phospholipid metabolism of the intestinal mucosa during fat absorption. J. Biochem. 56, 522-532 (1964)。
- 13) Gurr, M. I., Prottey, C. and Hawthorne, J. N.: The phospholipids of liver cell fraction. II. Incorporation of ( $^{32}\text{P}$ ) orthophosphate in vivo in normal and regenerating rat liver. Biochim. Biophys. Acta, 106, 357-370 (1965)。
- 14) Noma, A.: Studies on phospholipid composition of the intestinal mucosa. Sapporo Med. J. 25, 69-79 (1964)。
- 15) Collins, F. D. and Shotlander, V. L.: Studies on phospholipids. 7. The distribution of complex phospholipids in various species and tissues. Biochem. J. 79, 316-320 (1961)。
- 16) Skipski, V. P., Peterson, R. F., Sanders, J. and Barclay, M.: Thin-layer chromatography of phospholipids using silica gel without calcium sulfate binder. J. Lipid Res. 4, 227-228 (1963)。
- 17) Skidmore, W. D. and Entenman, C.: Two-dimensional thin-layer chromatography of rat liver phosphatides. J. Lipid Res. 3, 471-475 (1962)。
- 18) Skipski, V. P., Peterson, R. F. and Barclay, M.: Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography. Biochem. J. 90, 374-378 (1964)。
- 19) Skipski, V. P., Barclay, M., Reichman, E. S. and

- Good, J. J.: Separation of acidic phospholipids by one-dimensional thin-layer chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 137, 80-89 (1967).
- 20) Wuthier, R. E.: Two-dimensional chromatography on silicagelloaded paper for the microanalysis of polar lipids. *J. Lipid Res.* 7, 544-550 (1966).
- 21) 平山 寛: ラット肝切片によるミトコンドリアのレシチンおよびケファリン代謝の研究. 札幌医誌 39(3/4), 108-119 (1971).
- 22) McMurray, W. C. and Dawson, R. M. C.: Phospholipid exchange reaction within the liver cell. *Biochem. J.* 112, 91-108 (1969).
- 23) Williams, M. L. and Bygrave, F. L.: Incorporation of inorganic phosphate into phospholipids by the homogenate and by subcellular fraction of rat liver. *Eur. J. Biochem.* 17, 32-38 (1970).
- 24) Bjornstad, P. and Bremer, J.: In vivo studies on pathways for the biosynthesis of lecithin in the rat. *J. Lipid Res.* 7, 38-45 (1966).
- 25) Gibson, K. D., Wilson, J. D. and Udenfriend, S.: The enzymatic conversion of phospholipid ethanolamine to phospholipid choline in rat liver. *J. Biol. Chem.* 236, 673-679 (1961).
- 26) Wise, E. M. J. and Elwyn, D.: Rates of reactions involved in phosphatide synthesis in liver and small intestine of intact rats. *J. Biol. Chem.* 240, 1537-1548 (1965).
- 27) Paltauf, F.: The intestinal absorption of 1,2- and 1,3-dialkyl glycerol ethers and diether phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 176, 818-827 (1969).
- 28) Paltauf, F.: Biosynthesis of alkyl glycerol lipids in the intestinal mucosa in vivo and in a cell-free system. *Biochim. Biophys. Acta* 260, 345-351 (1972).
- 29) Paltauf, F.: Intestinal uptake and metabolism of alkyl acyl glycerophospholipids and of alkyl glycerophospholipids in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 260, 352-364 (1972).
- 30) 斎藤 徹: 小腸平滑筋のリン脂質代謝に関する研究. 2. ラット小腸平滑筋の acid labile および acid stable phosphatidylethanolamine について. 札幌医誌 42(3), 202-211 (1973).
- 31) 山田恵子: ラット小腸筋層および粘膜層の diacyl, alkenyl-acyl, alkyl-acyl glycerophosphorylethanolamine および -choline について. 札幌医誌 43, 269-277 (1974).
- 32) Subbaiah, P. V., Sastry, P. S. and Ganguly, J.: Acylation of lysolecithin in small intestinal mucosa of rats. *Biochem. J.* 118, 241-246 (1970).
- 33) Nilsson, A.: Intestinal absorption of lecithin and lysolecithin by lymph fistula rats. *Biochim. Biophys. Acta* 152, 379-390 (1968).
- 34) Gurr, M. I., Pover, W. F. R., Hawthorne, J. N. and Frazer, A. C.: Phospholipid composition and turnover in rat small intestinal mucosa during fat absorption. *Nature* 197, 79 (1963).
- 35) Sheltawy, A. and Dawson, R. M. C.: The metabolism of polyphosphoinositides in hen brain and sciatic nerve. *Biochem. J.* 111, 157-165 (1968).
- 36) Prottey, C., Salway, J. G. and Hawthorne, J. N.: The structures of enzymically produced diphosphoinositide and triphosphoinositide. *Biochim. Biophys. Acta* 164, 238-251 (1968).
- 37) Gallai-Hatchard, J. J. and Thompson, R. H. S.: Phospholipase A activity of mammalian tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 98, 128-136 (1965).
- 38) Epstein, B. and Shapiro, B.: Lecithinase and lysolecithinase of intestinal mucosa. *Biochem. J.* 71, 615-619 (1959).
- 39) Epstein, B. and Shapiro, B.: Intestinal lecithinase. *Nature* 180, 387 (1957).
- 40) Robertson, A. F. and Lands, W. E. M.: Positional specificities in phospholipid hydrolyses. *Biochemistry* 1, 804-810 (1962).
- 41) Sabbaiah, P. V. and Ganguly, J.: Studies on the phospholipases of rat intestinal mucosa. *Biochem. J.* 118, 233-239 (1970).
- 42) Ottolengi, A.: Phospholipase activity of rat tissues and its modification by trypsin. *Lipids* 2, 303-307 (1967).
- 43) Ottolengi, A.: Preparation and characterization of mouse intestinal phospholipase. *Lipids* 8, 415-425 (1973).
- 44) Robertson, A. F.: Lecithinase and lysolecithinase activity in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 116, 379-381 (1966).
- 45) Ottolengi, A.: High phospholipase content of intestines of mice infected with *hymenolepis nana*. *Lipids* 8, 426-428 (1973).
- 46) Schmidt, G., Bessman, M. J. and Thannhauser, S. J.: Enzymic hydrolysis of cephalin in rat intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 127-138 (1957).
- 47) Atherton, R. S. and Hawthorne, J. N.: The phosphoinositide inositolphosphohydrolase of guinea-pig intestinal mucosa. *Eur. J. Biochem.* 4, 68-75 (1968).
- 48) Waku, K. and Nakazawa, Y.: Hydrolyses of 1-0-alkyl-, 1-0-alkenyl-, and 1-acyl-2-(1-<sup>14</sup>C)-linoleoyl-glycero-3-phosphorylcholine by various phospholipases. *J. Biochem.* 72, 149-155 (1972).